

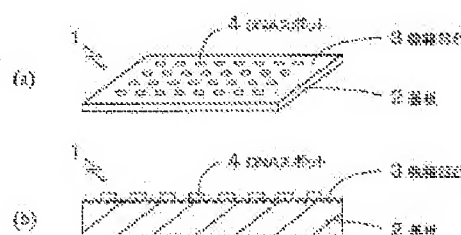
SUBSTRATE FOR BIOSENSOR AND BIOSENSOR USING THE SAME

Patent number: JP2003035710 (A)
Publication date: 2003-02-07
Inventor(s): ITO ARIMICHI +
Applicant(s): DAINIPPON PRINTING CO LTD +
Classification:
- international: C12M1/00; C12N15/09; G01N21/03; G01N21/64; G01N21/78; G01N33/53; G01N37/00; C12M1/00; C12N15/09; G01N21/03; G01N21/64; G01N21/77; G01N33/53; G01N37/00; (IPC1-7): C12M1/00; C12N15/09; G01N21/03; G01N21/64; G01N21/78; G01N33/53; G01N37/00
- european:
Application number: JP20010222370 20010724
Priority number(s): JP20010222370 20010724

Abstract of JP 2003035710 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To solve the problems that background noise cannot be ignored and it becomes an obstacle in the measuring sensitivity and resolution when a substrate is flat, that a droplet is easy to move when a spot is created, that the position accuracy of the spot is hard to ensure when the substrate is mat-worked to restrain reflection and the direction of emission of fluorescence in a detection is disturbed.

SOLUTION: The biosensor has a structure wherein an organic substance layer, a biologically active substance layer and the like are formed sequentially on one face of the substrate 2 on which fine irregularities 3 with a pitch of the wavelength of light or shorter are formed so as to prevent the reflection. Thereby, the problems can be solved.



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003-35710
(P2003-35710A)

(43)公開日 平成15年2月7日(2003.2.7)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 4 3
21/03		21/03	Z 2 G 0 5 4
21/64		21/64	F 2 G 0 5 7
21/78		21/78	C 4 B 0 2 4
37/00	1 0 2	37/00	1 0 2 4 B 0 2 9
審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001-222370(P2001-222370)

(22)出願日 平成13年7月24日(2001.7.24)

(71)出願人 000002897

大日本印刷株式会社

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

(72)発明者 伊東 有道

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

大日本印刷株式会社内

(74)代理人 100111659

弁理士 金山 聡

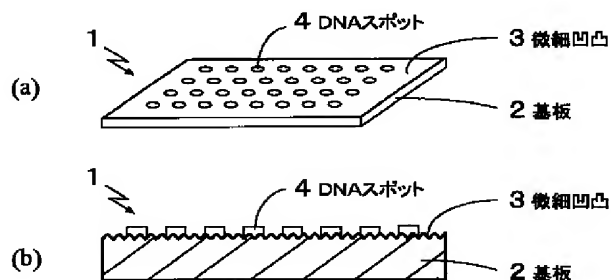
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 バイオセンサー用基板およびこれを用いたバイオセンサー

(57)【要約】

【課題】 基板が平坦な場合、表面反射によるバックグラウンドが無視できず、測定感度、解像度上の障害となっていた点、スポット作成の際に、液滴が移動しやすい点、あるいは、基板をマット加工して反射を抑制しようとする、スポットの位置精度を確保しづらいか、検出時の蛍光の発光する方向が乱れる原因となる点を解消する。

【解決手段】 基板2の片面に、光の波長以下のピッチの微細凹凸3を形成して反射を防止したものを基板とし、その上に、有機物質層、および生理活性物質層等を順次設けた構造のバイオセンサーとすることにより、上記の課題を解決することができた。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 透明基板の片面に光の波長以下のピッチの無数の微細凹凸が形成された凹凸面を有することを特徴とするバイオセンサー用基板。

【請求項2】 前記微細凹凸が、レーザー光を二もしくは三以上に分割して干渉露光させることにより、ピッチが光の波長以下の無数の微細凹凸が形成された凹凸型面を有する賦型用型を用いて得られたものであることを特徴とする請求項1記載のバイオセンサー用基板。

【請求項3】 前記微細凹凸上に有機物質層が積層されていることを特徴とする請求項1または2記載のバイオセンサー用基板。

【請求項4】 前記有機物質層がアミノ基もしくはメルカプト基を有するシランカップリング剤からなることを特徴とする請求項3記載のバイオセンサー用基板。

【請求項5】 請求項3または請求項4載のバイオセンサー用基板の前記有機物質層上に、生理活性物質層が固定されていることを特徴とするバイオセンサー。

【請求項6】 前記生理活性物質層が、核酸、非免疫蛋白質、免疫グロブリン結合性蛋白質、糖結合性蛋白質、糖を認識する糖類、リガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチド、もしくは免疫性蛋白質のいずれかからなることを特徴とする請求項5載のバイオセンサー。

【請求項7】 記生理活性物質層が前記有機質層を構成する有機物質と架橋剤により架橋されて固定されていることを特徴とする請求項6記載のバイオセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バイオセンサー基板の表面の光の反射を防止することにより、標識として用いた蛍光色素が発光して生じる蛍光の測定のバックグラウンドを減らすことができ、感度および解像度の向上を可能にするバイオセンサー用基板、およびこれを用いたバイオセンサーに関するものである。

【0002】

【従来の技術】バイオセンサーは、顕微鏡用のガラススライド大の基板上に、例えば、多種類の遺伝子DNAを個々のスポットに分けて貼付け、固定させ、検体としては予め蛍光剤等で標識を付けたものを適用した後、レーザービームを用いたスキャニングにより、蛍光を検出することにより、いずれのDNA部分が発光したかの発現パターンを求め、既知の発現パターンと比較することにより、遺伝子の発現プロファイルを求める等に利用されるものである。

【0003】しかしながら、従来のバイオセンサーの基板には、表面が平坦な素材が用いられており、蛍光測定の際に、表面反射によるバックグラウンドの存在が無視できず、測定感度の向上や解像度の向上の上で障害となっていた。また、多数の測定用のスポットを作成する際

に、スポット作成用液が所定の場所から移動しやすい欠点もある。また、表面のマット加工によって反射を抑制しようとする、多数のスポットを位置精度よく設定する際の障害となる上、検出時に、例えば、蛍光の発光する方向が乱れる原因となり得る。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明においては、従来、バイオセンサー用基板が平坦な素材からなる場合、表面反射による測定時のバックグラウンドが無視できず、測定感度、および解像度の向上の障害となっていた点や、スポット作成の際に、スポット作成用液が移動しやすい点、あるいは、マット加工したガラス板を用いることによって反射を抑制しようとする、スポット配置の際の位置精度を確保しづらい原因、もしくは検出時の蛍光の発光する方向が乱れる原因となる点を解消することを課題とする。

【0005】

【課題を解決する手段】例えば、透明板の表面に、光の波長以下のピッチの微細な凹凸パターンを形成した微細凹凸板は、凹凸の底部では、透明板の屈折率そのものを示し、凹凸の表面側に近づくほど、透明板を構成する素材が占める割合が低下して、代わりに空気の割合が増加するから、あたかも、光の屈折率が連続的に変化する層を多数積層したのと同様な効果を持ち、反射を防止し得ることが知られている。本発明においては、このような特殊な微細凹凸を、バイオセンサーの基板の表面の構造として持ち込むことにより、光の反射に関する点のみならず、課題として挙げたいずれの点も解消することが可能となった。

【0006】第1の発明は、透明基板の片面に光の波長以下のピッチの無数の微細凹凸が形成された凹凸面を有することを特徴とするバイオセンサー用基板に関するものである。第2の発明は、第1の発明において、前記微細凹凸が、レーザー光を二もしくは三以上に分割して干渉露光させることにより、ピッチが光の波長以下の無数の微細凹凸が形成された凹凸型面を有する賦型用型を用いて得られたものであることを特徴とするバイオセンサー用基板に関するものである。第3の発明は、第1または第2の発明において、前記微細凹凸上に有機物質層が積層されていることを特徴とするバイオセンサー用基板に関するものである。第4の発明は、第3の発明において、前記有機物質層がアミノ基もしくはメルカプト基を有するシランカップリング剤からなることを特徴とするバイオセンサー用基板に関するものである。第5の発明は、第3または第4の発明のバイオセンサー用基板の前記有機物質層上に、生理活性物質層が固定されていることを特徴とするバイオセンサーに関するものである。第6の発明は、第5の発明において、前記生理活性物質層が、核酸、非免疫蛋白質、免疫グロブリン結合性蛋白質、糖結合性蛋白質、糖を認識する糖類、リガンド結合

能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチド、もしくは免疫性蛋白質のいずれかからなることを特徴とするバイオセンサーに関するものである。第7の発明は、第6の発明において、記生理活性物質層が前記有機質層を構成する有機物質と架橋剤により架橋されて固定されていることを特徴とするバイオセンサーに関するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】図を引用して、本発明を説明する。図1は、本発明のバイオセンサーの概略を示す図で、基板2上に、例えば、微小なDNAスポット4が、格子状に配列したものであり、必要に応じ、このようなスポット4の数は、数千〜数十万であり得る。基板2は、DNAスポット4を有する側が、光の波長以下のピッチの無数の微細凹凸が形成された凹凸面となっているものである。この微細凹凸面は、レーザー光を二もしくは三以上に分割して干渉露光させることにより、ピッチが光の波長以下の無数の微細凹凸が形成された凹凸面を有する賦型用型を用いて得られたものであることが好ましい。

【0008】基板2の素材としては、バイオセンサー用基板として通常、使用されているものであれば、いずれの素材でもよく、一般的にはガラスや、レーザー光に対して透明な無機もしくは有機材料からなる。基板2の厚みは、1mm〜5mm程度である。必要により、基板2は、DNAスポット4を設けない側や側面に補強を施してあってもよい。基板2を構成し得る有機材料としては、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、セルロースアセテートブチレート、ポリエステル、ポリアミド、ポリイミド、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、ポリ塩化ビニル、ポリビニルアセタール、ポリエーテルケトン、ポリメタクリル酸メチル、ポリカーボネート、もしくはポリウレタン等の熱可塑性樹脂を挙げることができる。

【0009】光の波長以下のピッチの微細凹凸3の形状としては、図2(a)〜図2(e)に例示するような断面形状のものが有り得る。光の波長以下のピッチの微細凹凸3の形状としては、図2(a)に示すような断面の上縁の形状が正弦曲線のもの以外にも、図2(b)に示すような断面の頂部が円弧状で、立ち上がり部分が直線状であり、上へ行くほどすばまった形状のもの、もしくは図2(c)に示すような三角波状のもの等があり得る。

【0010】これらの図2(a)〜図2(c)に示す断面形状の微細凹凸3は、微細凹凸3の水平方向の位置によって深さが変動するので、特に好ましく、このような断面形状のものを使用すると、前に述べたように、深さによって、光の屈折率が連続的に変化し、通常、図中、上の方が屈折率が低く、下の方が屈折率が高い。

【0011】微細凹凸3の形状としては、図2(d)に示すような矩形波状のものや、図2(e)に示すような台形が倒立したような形状のものもあり得る。図2

(d)に示す形状のものでは、矩形波の部分では深さによらず、屈折率が一定であり、ピッチや波の幅を決めることにより、一定でかつ所定の値の屈折率を実現することができる。また、図2(e)に示す形状のものでは、図中、上の方が屈折率が高く、下の方が屈折率が低い。この断面形状は上すばまりでないので、型を用いて形成する際には離型が難しい。

【0012】微細凹凸3の平面的な配列は、微細凹凸3のある側の上側から観察すると、図3(a)に斜視図で示すように、平行な溝3aを形成したものと、図3

(b)もしくは(c)に上方から見た図(同心円は等高線を示す。)で示すように、平面的に並べて配列して形成したものとが有り得る。いずれのタイプのものも、反射防止性を有するが、図3(a)に示すような溝状のタイプのものは方向性を有するために、反射率の方向性が生じる可能性があり、図3(b)もしくは(c)に示すような二次元に配列した形状のものは、事実上、方向性が生じないので好ましい。

【0013】微細凹凸3aの形状自体には種々のものがあるにせよ、断面形状に表れる凹凸の波のピッチ(=周期)は、光の波長以下の微細なものである。ここで「光の波長」とは、可視光の波長を指し、従って、微細な程度を表現する「光の波長以下のピッチ」とは、ピッチが400nm以下であることを指す。ただし、測定が可視光よりも長波長側で行なわれる場合には、400nmとは限らない。ピッチの下限は特にないが、型を用いて形成する際の精度を考慮すると、50nm以上であることが好ましい。

【0014】微細凹凸3の断面形状の、波の高低差が大きい方が、反射率が低くなり、反射防止効果があるため、高低差は100nm以上であることが好ましい。上限は特に無いが、通常のピッチである50nm〜400nmを想定すると、ピッチの値の100%〜200%程度であることが好ましく、100nm〜500nm程度である。

【0015】基板2の微細凹凸3を有する面には、接着性の向上のために、通常、行なわれ得る各種の処理、即ち、コロナ放電処理、酸化処理等の物理的な処理のほか、アンカー剤(プライマー剤とも呼ばれる。)の塗布による化学的処理を予め行なって、アンカー層を形成しておいてもよい。

【0016】アンカー層を構成する樹脂としては、ポリエステル樹脂、ポリウレタン樹脂、ポリエチレンイミン樹脂、ポリブタジエン系樹脂、アクリル樹脂、ポリカーボネート樹脂、もしくは塩化ビニル/酢酸ビニル共重合体等である。これらの樹脂のうち一種もしくは二種以上を適宜な溶剤に溶解して塗料もしくはインキとしたもの

を塗付もしくは印刷してアンカー層を形成する。このほか、アルキルシタネート系のアンカー剤を使用してアンカー層を形成することもできる。

【0017】基板2の表面の微細凹凸3は、最も効率的には、微細凹凸3の逆型形状を型面として持つ賦型用型を用いて形成され、基板2がガラスであれば、ガラス板製造時の熔融状態、もしくは一旦製造したガラス板を再度熔融した状態で、賦型用型を押し付けることにより、形成することができる。基板2が熱可塑性樹脂で構成される場合には、微細凹凸3は、基板2の製造時の熔融状態もしくは液体状態で賦型用型を用いることにより、形成することができる。

【0018】あるいは、プラスチックの射出成形やアクリル樹脂の注型重合等の際に、型の内面に、微細凹凸3の逆型形状を形成しておき、熔融樹脂を射出、または、モノマーもしくはプレポリマーを注入することにより、微細凹凸3を形成することができる。また、これら射出成形やアクリル樹脂の注型重合の際に、型の内面に、微細凹凸3の逆型形状を有するフィルム状物を配置しても、同様な結果を得ることができる。

【0019】微細凹凸3は、電離放射線硬化性樹脂組成物を用いて形成することもできる。この場合、電離放射線硬化性樹脂組成物の硬化物からなる基板2上に微細凹凸3が直接形成されたもの、基板2上に、電離放射線硬化性樹脂組成物の硬化物からなる透明層が積層され、その透明層上に微細凹凸3が形成されたもの、もしくは基板2とは別の、例えば、薄い透明フィルムに微細凹凸3が形成された透明層が積層されたものが、基板2上に積層されたもの等があり得る。

【0020】電離放射線硬化性樹脂組成物としては、硬化後の硬度が、JIS K5400で示す鉛筆硬度試験で「H」以上の硬度を示すものがより好ましい。また、透明層の光の屈折率は、反射防止性能を発揮するためには低い方が好ましいが、長期間使用するには、表面の耐久性、特に耐擦傷性が必要であり、硬度を高くした方が有利になるため、密度を上げて硬度を高くする必要がある。従って、透明層の光の屈折率としては、1.4～1.7、より好ましくは、1.6以下である。

【0021】電離放射線硬化性樹脂組成物としては、分子中に重合性不飽和結合または、エポキシ基を有する化合物のプレポリマー、オリゴマー、及び／又はモノマーを適宜に混合したものであり、分子中に重合性不飽和結合または、エポキシ基を有する化合物としては、具体的には、ポリエステル(メタ)アクリレート、ウレタン(メタ)アクリレート、エポキシ(メタ)アクリレート、ポリエーテル(メタ)アクリレート、ポリオール(メタ)アクリレート、メラミン(メタ)アクリレート、トリアジン系アクリレート等を挙げることができる。

【0022】「電離放射線硬化性樹脂組成物」における

電離放射線とは、通常は、紫外線又は電子線を指す。電離放射線が紫外線であるときは、電離放射線硬化性樹脂組成物として、アセトフェノン類、ベンゾフェノン類、チオキサントン類、ベンゾイン、ベンゾインメチルエーテル等の公知の光重合開始剤や光重合促進剤を添加したものを用いる。

【0023】電離放射線硬化性樹脂組成物の硬化物への微細凹凸3の形成は、複製用の賦型用型を作製して行なうことが効率的である。賦型用型を作製するには、適当な型基材上に、感光性樹脂を積層しておき、これにレーザー光干渉法により露光を行なう。なお、型基材に感光性樹脂を積層したものとして、レリーフホログラム製造用の市販の感光材を利用してもよい。

【0024】露光は、レーザー光を二もしくは三以上に分割して干渉させることにより行ない、露光後、感光性樹脂の種類に応じた現像を行なって、ピッチが光の波長以下の無数の微細凹凸が形成された凹凸型面を有する賦型用型の原型を得る。

【0025】得られた原型は、通常、耐久性が充分ではないので、量産に用いる際には、この原型にニッケル等の金属でめっきを行なって剥がし、第1の金属製の型を形成して使用するか、または第1の金属製の型にさらにめっきを行なって、第2の金属製の型を幾つか形成して使用することが好ましく、このように原型から複製された型を使用すると、型の損傷や摩耗の問題を回避することができる。

【0026】賦型用型をローラ面上に形成し、必要に応じて、複製(同一版面上に多面付けにすること)した型ローラや、型面の形状をローラの面長方向および円周方向に、連続的に形成したエンドレスの型ローラを使用すると、連続的な生産に向く。

【0027】ここで、原型と第2の金属製の型とは型面の形状が同形状であり、原型と第1の金属製の型とは片面の形状が互いに逆型形状の関係となる。また微細凹凸3の形状と、それを製造するための型上の型面の微細凹凸の形状とは逆型形状となるので、バイオセンサー用基板として欲しい微細凹凸の形状が得られるよう、必要に応じて、めっきによる金属型の形成を繰返して、微細凹凸の形状を逆転させるとよい。ただし、微細凹凸の断面形状が正弦曲線のような場合には、元の型形状と逆型形状の違いが無い場合もある。この明細書における、賦型用型の型面の微細凹凸の形状は、上記の例外的な場合を除き、バイオセンサー用基板上に希望する微細凹凸の形状が形成されるよう、逆型形状に形成されているものとする。

【0028】電離放射線硬化性樹脂組成物の硬化物上に微細凹凸3を形成するには、例えば基板2と上記の賦型用型とを準備し、まず、両者を液状の電離放射線硬化性樹脂組成物を介して積層する。電離放射線硬化性樹脂組成物は、先に基板2側に積層してもよいし、あるいは、

先に賦型用型と積層してもよい。

【0029】積層後、電離放射線硬化性樹脂組成物に電離放射線を照射する。電離放射線の照射により、電離放射線硬化性樹脂組成物が硬化して硬化物が生成し、かつ、基板2に接着するので、電離放射線の照射の後、電離放射線硬化性樹脂組成物の硬化物を透明基板ごと、賦型用型から離型することにより、表面に微細凹凸が形成された電離放射線硬化性樹脂組成物の硬化物からなる透明層が、基板2上に、積層された積層体を得ることができる。なお、得られた積層体から基板2を剥がすことにより、表面に微細凹凸が形成された電離放射線硬化性樹脂組成物の硬化物からなる透明層を単独で得ることができる。

【0030】上記の工程は、型ローラに連続する透明フィルムを供給し、型ローラと透明フィルムとの間に電離放射線硬化性組成物を供給し、電離放射線硬化性組成物を透明フィルムごと型ローラに巻き付けた状態で電離放射線を照射して、電離放射線硬化性組成物を硬化させることにより、連続的に行なうことができる。

【0031】基板2の微細凹凸3上には、好ましくは、UVオゾンクリーナー等により、表面の清浄化を行なった後、生理活性物質層を直接形成するか、もしくは有機物質層を介して生理活性物質層を形成してバイオセンサーとする。

【0032】図4は、有機物質層を介して生理活性物質層を形成する場合の一例を模式的に示す図であり、この例では、基板2の微細凹凸3を有する側にアミノ基を導入し(図4(a))、アミノ基を利用してDNAを固定し(図4(b))、使用の際には、蛍光剤で標識したRNAが相補的な構造を有する特定のDNAと結合する(図4(c))ことを示している。こののち、レーザー光等を当てることにより、蛍光剤で標識したRNAが結合した個所から蛍光発光が得られる。

【0033】同様に、基板2の微細凹凸3を有する側にメルカプト基を導入し(図5(a))、メルカプト基を利用して架橋剤により既知の蛋白質(符号; Pr)を一定の位置に固定し(図5(b))、蛍光剤で標識した検体の蛋白質が、バイオセンサー上の既知の蛋白質Prと結合するタイプである場合には、結合する(図4(c))ことを示している。やはり、レーザー光等を当てることにより、蛍光剤で標識した検体の蛋白質が結合した個所から蛍光発光が得られる。

【0034】以上は好ましい例であるが、ここで導入したアミノ基やメルカプト基(実際にはこれらを有する化合物)は、広くは、有機物質層として位置づけることができ、また、DNAや蛋白質は、生理活性物質層として位置付けることができる。

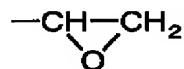
【0035】有機物質層は、好ましくは下記(1)～(8)のような官能基を有する化合物から構成される。

(1) -COOH基、-CHO基、-SH基、-NH₂

基、-OH基、=NH基、-CONH₂基、-NCO基、-COOR基(Rは(CH₂)_nH)(nは1以上)である。)、-(O(CH₂)_m)_nOH基(m、nはいずれも1以上)、もしくは下記「化1」で示す官能基のいずれか一または二以上を有することを特徴とする化合物。

【0036】

【化1】



【0037】(2) 窒素を含む化合物。

【0038】(3) (イ) -COOH基、-COOR基(Rは(CH₂)_nH)(nは1以上)である。)、-SH基、-NH₂基、-OH基、=NH基、-CONH₂基、もしくは-(O(CH₂)_m)_nOH基(m、nはいずれも1以上)の官能基の単独又は複数種が一分子内に合計で二以上存在する化合物と、(ロ) -NCO基が二以上存在する化合物の共重合体。なお、以降の記述において、(イ)および(ロ)は、上記の内容の化合物を指す。

【0039】(4) (イ)の化合物の複数種、(ロ)の化合物の複数種、または(イ)の化合物の複数種、および(ロ)の化合物の複数種をモノマーとする重合体。

【0040】(5) (イ)の化合物であって、-NH₂基を二以上持ち、-COOH基、-COOR基(Rは(CH₂)_nH)(nは1以上)である。)、-SH基、-OH基、=NH基、-CONH₂基、または-(O(CH₂)_m)_nOH基(m、nはいずれも1以上)を一以上持つ化合物をモノマーとする重合体。

【0041】(6) (イ)の化合物であって、-NH₂基、-COOH基、-SH基、-OH基、=NH基、-CONH₂基、または-(O(CH₂)_m)_nOH基(m、nはいずれも1以上)の官能基の単独または複数種を一分子内に二以上持ち、更に-COOR基(Rは(CH₂)_nH)(nは1以上)である。を一以上持つ化合物をモノマーとする重合体。

【0042】(7) (イ)の化合物であって、-NH₂基、-OH基又は=NH基の官能基の単独または複数種を一分子内に二以上持ち、更に-SH基、-COOH基、-COOR基(Rは(CH₂)_nH)(nは1以上)である。)、または-(O(CH₂)_m)_nOH基(m、nはいずれも1以上)を一以上持つ化合物をモノマーとする重合体。

【0043】(8) (ロ)の化合物であって、-NCO基を二以上持ち、かつ-COOR基(Rは(CH₂)_nH)(nは1以上)である。を一以上持つ化合物をモノマーとする重合体。

【0044】生理活性物質層を構成する生理活性物質としては、被測定物質と相互作用するものであれば特に限

定されないが、例えば、核酸や、非免疫蛋白質、免疫グロブリン結合性蛋白質、糖結合性蛋白質、糖を認識する糖鎖、リガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチド、あるいは免疫性タンパク質等が挙げられる。

【0045】具体的には、核酸として、DNA、RNA、もしくはPNA (Peptide Nucleic Acid) 等、非免疫蛋白質として、アビジン (ストレプトアビジン)、ビオチン、もしくはレセプター等、免疫グロブリン結合性蛋白質として、プロテインA、プロテインG、もしくはリウマチ因子 (RF) 等、糖結合性蛋白質としてレクチン等、免疫性タンパク質として抗体等がある。

【0046】生理活性物質層の厚さは、生理活性物質層を構成する生理活性物質自体の大きさにもよるが、100Å~3000Åであることが好ましく、100Å~1000Åであることがより好ましい。

【0047】本発明のバイオセンサー用基板上において、生理活性物質層がアミノ基を有する生理活性物質で構成されている場合、アミノ基を有する生理活性物質が、有機物質層を構成する有機物質と架橋剤により架橋されることにより、生理活性物質層が有機物質層を介して固定されていてもよい。

【0048】架橋剤は、例えば、水溶性二価性試薬であって、生理活性物質を共有結合的に強固に固定化できるものであれば、特に限定されないが、例えば、グルタルアルデヒド、過ヨウ素酸、N, N'-o-フェニレンジマレイミド、N-スクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート、N-スクシニミジルマレイミド酢酸、N-スクシニミジル-4-マレイミド酢酸、N-スクシニミジル-6-マレイミドヘキサ酸、N-スルホスクシニミジル-4-マレイミドメチルシクロヘキサ-1-カルボン酸、N-スルホスクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-(4-マレイミドブチロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-(6-マレイミドカプロイロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-(8-マレイミドカプリロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-(11-マレイミドウンデカノイロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、もしくはN[2-(1-ピペラジニル)エチル]マレイミド・二塩酸等を挙げることができ、それぞれ単独で又は組み合わせて使用することができる。

【0049】このような架橋剤を使用すると、生理活性物質層を構成する生理活性物質を共有結合で強固に固定することができ、バイオセンサーを洗浄しても、生理活性物質の固定を維持できるため、繰り返し測定に適する利点が得られる。架橋剤は、層の厚みとしては10Å~100Åであることが好ましく、10Å~50Åであることがより好ましい。

【0050】本発明のバイオセンサー用基板の製造は次のようにして行なう。まず、前記したような方法により、基板2の表面にピッチが光の波長以下である微細凹凸3を形成したものを準備し、その微細凹凸3を有する面側に、有機物質層を積層する。有機物質層の形成は、例えば、基板2の表面に過酸化水素水を作用させることにより、基板の表面にOH基を導入し、導入されたOH基を利用して行なうことができる。例えば、アミノ系シランカップリング剤やメルカプト系シランカップリング剤を用いて、基板2の表面に、アミノ基、もしくはメルカプト基を導入する。

【0051】また、有機物質層の形成は、前述した化合物をモノマーとする蒸着重合によって行ってもよく、通常の蒸着重合装置を使用して行なうことができる。蒸着重合の条件としては、成膜速度が1Å/min~3000Å/min、特に5Å/min~200Å/minとなるように設定するのが好ましい。3000Å/minを超えると、均質な蒸着重合膜が得られにくくなる。具体的には、モノマー原料の加熱温度を50℃~150℃とし、蒸着対象となる基板、この場合は微細凹凸を有し、金属薄膜層が積層された透明基板、の温度を室温、または10℃~20℃とし、圧力を 1.0×10^{-3} Paとするのが好ましい。

【0052】有機物質層上には、生理活性物質層を固定化する。あるいは、生理活性物質層12は、有機物質層を伴わないで、基板2に固定することもある。固定化方法は常法によって行えばよく、例えば、所定量の生理活性物質を、有機物質層もしくは基板2上に、所定時間接触させることにより固定することができる。

【0053】生理活性物質として抗体を用いた場合であって、抗体のFabフラグメントを固定する場合には、パバインを用いて抗体を部分分解した後、同様の処理を行えばよい。一方、抗体のF(ab')₂フラグメントを固定する場合には、ペプシンを用いて抗体を部分分解した後、同様の処理を行えばよい。

【0054】生理活性物質層が、アミノ基を有する生理活性物質で構成され、有機物質層に固定されるときには、アミノ基を有する生理活性物質と、有機物質層を構成する有機物質とを架橋剤により架橋することにより、固定することができる。具体的には、有機物質層上に架橋剤を接触させて反応させ、有機物質と架橋剤とを結合させた後、架橋剤が結合した有機物質層上にアミノ基を有する生理活性物質を接触させて、架橋剤とアミノ基とを反応させることにより固定を行なう。

【0055】基板2の微細凹凸3を有する側の表面に、メルカプト系シランカップリング剤を用いて、メルカプト基を導入した場合には、SPDP (SPDP; N-Succinimidyl-3-(2-Pyridyldithio) Propionate) を架橋剤として用い、蛋白質等を固定するとよい。

【0056】本発明のバイオセンサーは、本発明において独特な基板を用い、生理活性物質を個々のスポットに分ける等して貼付け、固定させ、検体としては予め蛍光剤等で標識を付けたものを適用した後、レーザービームを用いたスキャンニングにより、蛍光を検出することにより、検体中の成分を確認することができ、多種類の生理活性物質を適用しておけば、いずれの部分が発光したかの発現パターンを求め、既知の発現パターンと比較する等により、検体が持つ情報を求めることができ、一例として、遺伝子の解析等に利用すると価値が高いものである。

【0057】

【実施例】（実施例1）感光性樹脂をプラスチックフィルム上に塗布して形成した感光材を準備し、感光性樹脂に対してレーザー光干渉法による露光を行ない、その後、現像を行なって、ピッチが光の波長以下の無数の微細凹凸が型面に形成された原型を得た。この原型の型面にニッケルメッキを行なって剥がし、ニッケル型を得た。

【0058】得られたニッケル型を、溶融したガラスの表面に型面側が当るよう適用して、ピッチが光の波長以下の無数の微細凹凸が表面に形成されたガラス基板を得た。得られたガラス基板の微細凹凸を有する側をオゾンクリーナーで洗浄した後、洗浄面に過酸化水素水で処理を行なって、表面にOH基を導入し、導入されたOH基にメルカプト系シランカップリング剤を用いて、表面にSH基を導入した。

【0059】このようにして得られたバイオセンサー用基板は、例えば、SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-Pyridyldithio) Propionate) の略、SH基およびアミノ基反応性の架橋剤を用い、既に表面に導入されたSH基と蛋白質のアミノ基との間の架橋を行なわせることにより、表面に被測定物質との相互作用をする蛋白質を固定して、バイオセンサーとし、測定に使用することができた。

【0060】このバイオセンサーは、基板が、レーザー光を二もしくは三以上に分割して干渉露光させることにより、ピッチが光の波長以下の無数の微細凹凸が形成された凹凸型面を有する賦型用型を用いて得られた微細凹凸を有する面に蛋白質が固定されているので、基板のガラス板の表面反射が無く、蛍光測定時のバックグラウンドが実質的に生じないこと、また、凹凸が波長以下の微細なものであるために蛍光が散乱する等の支障も無く、測定感度上、解像度上の問題が無かった。また、凹凸が非常に微細であるため、蛋白質を固定する際のスポットティングの際に、滴下した液体が広がる事も無く、保持性がよいため、蛋白質のスポットを精度よく作成することができた。

【0061】（実施例2）トリアセチルセルロース（＝

TAC）フィルム上に、アクリレート系の紫外線硬化性樹脂を塗布し、実施例1で得られたニッケル型の型面を塗付面に重ね、TACフィルム側より、紫外線を照射して紫外線硬化性樹脂を硬化させ、その後、型から剥がすことにより、表面にピッチが光の波長以下の無数の微細凹凸が形成された透明樹脂層がTACフィルム上に積層した透明基板を得た。以降は、実施例1と同様に行ない、同様な結果を得た。

【0062】

【発明の効果】請求項1の発明によれば、基板に光の波長以下のピッチの微細凹凸が形成された構成とすることにより、表面反射が無く、光学的な測定に際してバックグラウンドが生じる等の支障が無く、また、凹凸そのものは光の波長以下の微細なものなので、スポットティングの際の位置精度が確保できるバイオセンサー用基板を提供することができる。請求項2の発明によれば、微細凹凸が、レーザー光による干渉露光により形成された凹凸型面を有する賦型用型を用いて形成されたものであるので、請求項1の発明の効果を一層発揮できるバイオセンサー用基板を提供することができる。請求項3の発明によれば、微細凹凸面に有機物質層を有しているため、生理活性物質層を固定しやすいバイオセンサー用基板を提供することができる。請求項4の発明によれば、有機物質層がアミノ基、もしくはメルカプト基を有するシランカップリング剤からなるため、蛋白質等の固定が容易なバイオセンサー用基板を提供することができる。請求項5の発明によれば、請求項3または請求項4の発明のバイオセンサー用基板の有機物質層上に生理活性物質層が固定されているため、そのまま、測定用に供し得るバイオセンサーを提供することができる。請求項6の発明によれば、請求項5の発明の効果に加え、生理活性物質層を構成する物質が特定され、各物質に応じた被測定物質の測定に利用することが可能なバイオセンサーを提供することができる。請求項7の発明によれば、請求項6の発明の効果に加え、生理活性物質層と有機物質層とが架橋剤により架橋されて固定されているため、生理活性物質が安定に固定されたバイオセンサーを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】バイオセンサーを示す図である。

【図2】基板の微細凹凸を示す図である。

【図3】基板の微細凹凸の配列を示す図である。

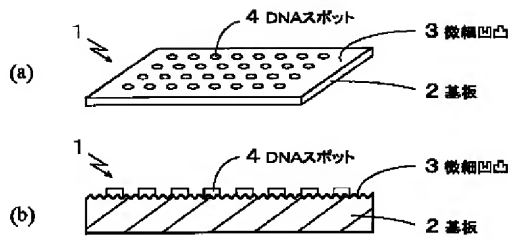
【図4】バイオセンサーの一例を説明する図である。

【図5】他の例のバイオセンサーを説明する図である。

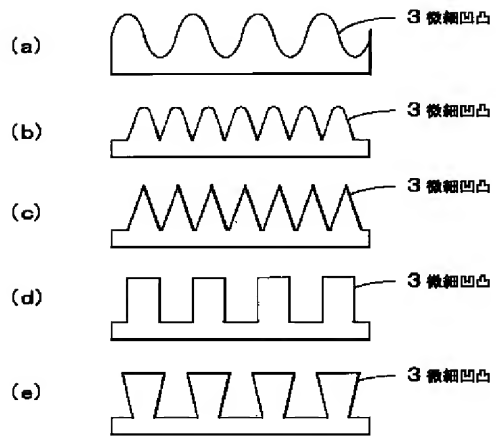
【符号の説明】

- 1 バイオセンサー
- 2 基板
- 3 微細凹凸
- 4 DNAスポット

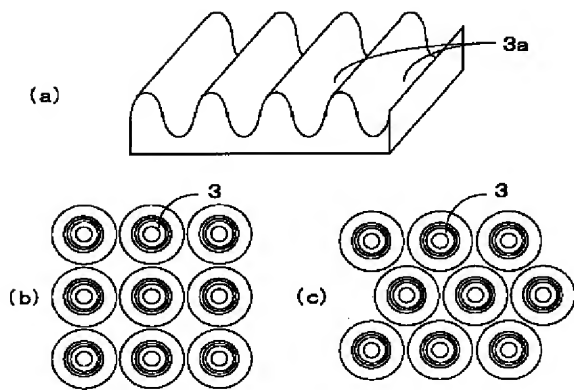
【図1】



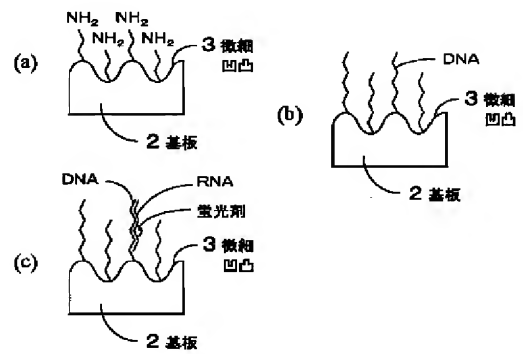
【図2】



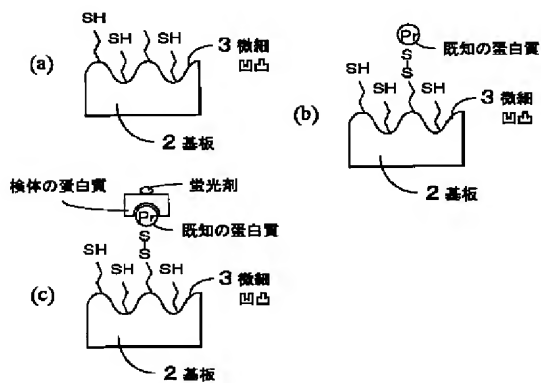
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	備考(参考)
// C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	F

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 EA01
GA07 GB05 LA01 MA01
2G054 AA06 BB06 CA21 EA03 GA05
GB02 GE02 GE07 JA10
2G057 AA04 AB04 AC01 BA03 BD04
CB01 DA06 DA09 DA10
4B024 AA11 CA01 CA11 HA12
4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC08
FA03 FA10